

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002071565 A
(43) Date of publication of application: 08.03.2002

(51) Int. Cl G01N 21/64
G01N 37/00

(21) Application number: 2000268349
(22) Date of filing: 05.09.2000

(71) Applicant: HITACHI LTD
(72) Inventor: SAITO MITSUHIRO
YASUDA KAZUO

(54) FLOW-TYPE TIME-RESOLVED MEASURING
METHOD AND ANALYTICAL SYSTEM USING
IT

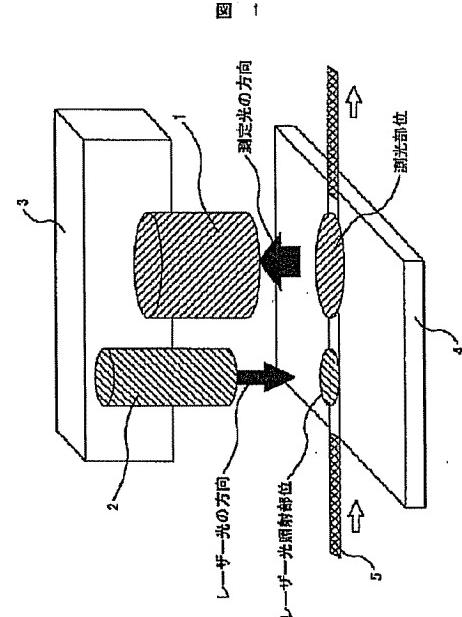
uses the measuring method.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a flow-type time-resolved technique which uses a fluorescence measuring apparatus or a phosphorescence measuring apparatus and which reduces the influence of disturbing light as an obstacle in the analysis of scattered light, interference light or the like generated when objects other than a sample are irradiated with excitation light, and to provide an analytical system by which a trace component in the sample can be measured with high sensitivity by using the technique.

SOLUTION: In the flow-type time-resolved measuring method, the fluorescence measuring apparatus or the phosphorescence measuring apparatus is used, the sample is guided to a pipe or a groove formed on a microdevice, and light is measured in a different positions on the microdevice when the sample on the microdevice is irradiated with the excitation light and when the light is emitted from the sample. The analytical system



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-71565

(P2002-71565A)

(43)公開日 平成14年3月8日(2002.3.8)

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 21/64
37/00

識別記号

1 0 1

F I

G 0 1 N 21/64
37/00

テマート(参考)

B 2 G 0 4 3
1 0 1

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全5頁)

(21)出願番号

特願2000-268349(P2000-268349)

(22)出願日

平成12年9月5日(2000.9.5)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 斎藤 充弘

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株

式会社日立製作所計測器グループ内

(72)発明者 保田 和雄

茨城県ひたちなか市大字市毛1202番地

(74)代理人 100074631

弁理士 高田 幸彦 (外1名)

Fターム(参考) 2G043 AA01 CA03 DA05 EA01 EA02

FA03 GA04 GA07 GB01 GB19

GB21 HA01 JA03 KA09 LA01

LA03 MA01

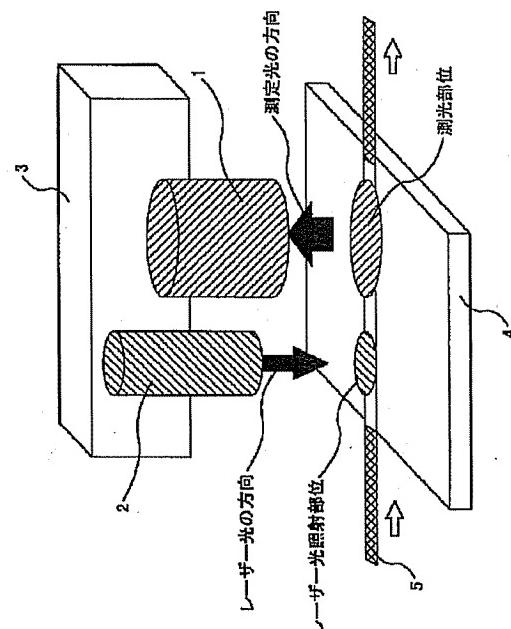
(54)【発明の名称】 フロウタイプ時間分解測定法とそれを用いた分析システム

(57)【要約】

【課題】本発明は、蛍光測定装置又は磷光測定装置を用いて、励起光が試料以外の物に照射されることによる散乱光や干渉光等の分析上、障害となる攪乱光の影響を低減したフロウタイプ時間分解手法及びそれを用いた試料中の微量成分を高感度で測定できる分析システムを提供する。

【解決手段】蛍光測定装置又は磷光測定装置を用いて、試料をマイクロデバイス上に形成された管又は溝に導き、前記マイクロデバイス上の該試料に対する励起光の照射時と前記試料からの発光時で前記マイクロデバイス上の異なる位置で測光されるフロウタイプ時間分解測定法とそれを用いた分析システム。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて、試料をマイクロデバイス上に形成された管又は溝に導き、前記マイクロデバイス上の該試料に対する励起光の照射時と前記試料からの発光時で前記マイクロデバイス上の異なる位置で測光されることを特徴とするフロウタイプ時間分解測定法。

【請求項2】蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて、試料をマイクロデバイス上に形成された管又は溝に導き、該試料に対する励起光の測定時と前記試料からの発光の測定時で、前記マイクロデバイス上の前記試料の位置を変えることにより、前記試料以外からの分析攪乱光（散乱光又は干渉光）の検出を除去又は低減することを特徴とするフロウタイプ時間分解測定法。

【請求項3】請求項1又は2において、試料がマイクロデバイスの管、溝又は間隙の中を一方方向に光源より励起光を照射した状態で移動した後、該照射光の中心部と異なる位置にある試料からの発光の測光値を基に分析測定を行うことを特徴とするフロウタイプ時間分解測定法。

【請求項4】励起光源と測光器を有する蛍光測定装置又は燐光測定装置と、試料を移動するための管又は溝を有するマイクロデバイスとを有し、試料を前記マイクロデバイス上に形成された管又は溝に導き、前記マイクロデバイス上の該試料に対する励起光の照射時と前記試料からの発光時で前記試料を異なる位置で測光するフロウタイプ時間分解測定法により微量成分を分析することを特徴とする分析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は蛍光測定装置又は燐光測定装置における試料の時間分解分析測定方法とそれを用いた分析システムに関する。

【0002】

【從来の技術】蛍光測定装置、燐光測定装置、又は化学発光計測装置は、試料にランプ又はレーザーを光源とする励起光を照射することにより発生する試料の発光を計測する。この発光の計測において、(1)同時に励起光の照射を受ける試料容器、レンズ、フィルター等の発光、蛍光、燐光も測定される。(2)発光、蛍光、燐光を照射光の対照側で計測(測光)すると励起ランプ又はレーザーの残光も計測される。等の試料以外からの散乱光及び干渉光(発光、蛍光、燐光)の影響が計測され精度の向上の障害となっている。

【0003】即ち、試料以外からの攪乱光(蛍光、燐光)が試料中に測定対象成分が含まれているものとして計測される。

【0004】また、この攪乱光は強度のバラツキが大きく、分析精度(最小検出限界)を著しく低下させ、微量成分の分析の障害となっている。

【0005】従来、ランプ、レーザー、レンズ、フィルターあるいは試料容器からの散乱光、干渉光を減すために、蛍光の小さい材料を選択する、材料の使用量を減らす、材料表面に攪乱光を遮蔽するためのコーティングする等の対応がされてきた。

【0006】また、ランプ、レーザーは照射終了後、その荷電圧、形状、ガス圧等の改良、調整により残光が抑制してきた。

【0007】励起光の照射の方向が測光の方向と同じ透過面蛍光測定方式、方向が異なり励起光を直接、分析装置の検出部に照射することのない側面蛍光測定方式又は照射面螢光測定方式等がある。

【0008】更に、励起光の波長と発光・螢光波長の差(以下ストークスシフトという)を大きくし、波長選択フィルターを介在させ励起光の波長と同等の波長の発光・螢光波長の検出を回避する発光体、螢光体が提案されている。

【0009】また、燐光持続時間の長い発光体を用い、励起光の照射時間と異なる時間に燐光測定を行う時間分解測定手法が提案されている。ユーロピウム等の希土類元素を用いた発光体はストークスシフトが大きく螢光持続時間の長い、それを測定対象物に標識した分析測定手法が開示されている。

【0010】しかし、上記の方法は散乱光、干渉光等の非特異光を十分に減らすことは難しく、試料以外に由来する干渉光の回避が課題となっている。この根本的な解決は試料が照射時と発光時で分析装置内の同一位置に設定される限り難しい。

【0011】ところで、時間分解測定法は、励起光が測光器に入射する事がないように、励起光の消灯した時間帯に測光時間を設定できる。例えば、フラッシュランプを $10\mu\text{秒}$ 間(1000Hz)点灯させ、 $1\text{m}\text{秒}$ サイクルで測光を行い、この 1秒 間分を積算しデータ表示する。しかし、この 1秒 間に励起光が試料に照射される時間は $10\text{m}\text{秒}$ 間と短かい。このため、時間単位の光量を増大させても積算される光量が小さく、より微量試料の検出感度(分析精度)の向上、測定時間の短縮が難しい状況である。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】蛍光測定装置、燐光測定装置、これらを適用した自動分析装置においては、試料中の微量成分を測定対照物とする場合、上記の攪乱光は精度の高い分析測定を阻害する。また、該攪乱光は、試料中の微量ではあるが重要な成分の検出の障害となっている。

【0013】本発明の目的は、蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて、試料のフロウタイプ時間分解手法により、励起光照射時と発光測定時の試料の場所が異なるよう試料を移動させ、励起光が試料以外の物に照射されることによる散乱光や干渉光等の分析上、障害となる非

特異的な蛍光又は燐光の影響を低減し、高感度の分析測定法を提供するものである。

【0014】また、本発明の時間分解測定法においては、マイクロデバイスの表面に設けた溝に試料を一方方向に流し続けながら励起光を照射した状態の励起光を測定し、次いで、前記の照射光の中心とは異なる位置にある試料からの発光を測定した値を基に分析測定を行うものであって、試料へ間断のない励起光の照射により強い蛍光、燐光が照射光の中心とは異なる部位において測光するために試料中の微量成分を高感度で測定できる分析システムを提供する。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記の課題は以下に記載の本発明により解決できる。その要旨は、

(1) 蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて試料の時間分解手法による分析測定を行うフロウタイプ時間分解測定法において、前記試料をマイクロデバイス上で移動させ前記試料に対する励起光照射時と前記試料からの発光測定時で、前記マイクロデバイス上の前記試料の位置が異なるように設定したフロウタイプ時間分解測定法である。

(2) 蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて試料の時間分解手法による分析測定を行うフロウタイプ時間分解測定法において、前記試料をマイクロデバイス上で移動させ前記試料に対する励起光照射時と前記試料からの発光測定時で、前記マイクロデバイス上の前記試料の位置が異なるように設定し、励起光及び試料ホルダーに由来する散乱光あるいは干渉光の検出を抑えたフロウタイプ時間分解測定法である。

【0016】前記のマイクロデバイスが溝又は間隙を有し、試料が前記溝又は間隙を一方方向に光源より励起光を照射した状態で移動した後、照射光の中心とは異なる位置にある試料の発光の測光値を基に試料の分析測定することが好ましい。

(3) 蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて試料の時間分解手法による分析測定を行うフロウタイプ時間分解測定法を用いた分析システムにおいて、前記試料をマイクロデバイス上で移動させ励起光照射時と発光測定時で、前記マイクロデバイス上の試料の位置が異なるように設定し、励起光及び試料ホルダーに由来する散乱光あるいは干渉光の検出、測定を抑えたフロウタイプ時間分解測定法を用いた分析システムであり、前記のマイクロデバイスが溝又は間隙を有し、試料が前記溝又は間隙を一方方向に光源より励起光を照射した状態で移動した後、照射光の中心とは異なる位置にある試料の発光の測光値を基に試料の分析測定することが好ましい。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明は、照射光に由来する照射部位の試料とは関係しない散乱光、又は干渉光（攪乱光）を除くか低減させ、試料のみに由来する蛍光、燐光

を計測して極微量成分を高精度で分析する方法を提供する。

【0018】本発明において、蛍光測定装置又は燐光測定装置を用いて、試料の時間分析測定する場合、試料はマイクロデバイス上の管状あるいは溝状の流路を流れれる。測光器の上流に設けられたレーザー又はランプの励起光の照射を受けた試料は蛍光又は燐光を発しつつ、測光器の測光を受ける位置に移動する。

【0019】測光器により計測を受けた発光データはコンピュータで処理され、試料の測定値が表示される。試料が励起光照射を受けた位置と試料がその発光の測光を受ける位置が異なるため、この位置の測定値は試料以外の蛍光の測定値を略零に近い極めて低く抑えることにより、精度の高い分析測定ができる。

【0020】また、上記の測光器が励起光照射装置の試料を挿んで反対側に設けられた透過光測定方式を用いる場合、励起光方向と測光方向が平行していても同一直線上にないため、励起光照射装置にあるランプ、レーザー、レンズあるいはフィルターに由来する干渉光の測光は回避される。

【0021】本発明の分析装置に用いられるレーザー装置、CCDカメラ、フォトダイオードアレー等の進歩は著しい。また、マイクロチップ又はマイクロデバイスを用いた遺伝子、タンパク質等の超微量成分の分析が重要性を増している。

【0022】本発明において、試料をマイクロデバイスを用いて分析測定する場合、マイクロデバイスの表面に管状又は溝状の流路が形成され、この流路を流れる試料はレーザーにより励起光の照射を受けた後、燐光又は蛍光を発しつつ下流に流れ測光器により測光計測を受けたり、CCDカメラの画像に捕らえられ画像データ処理された後、照射部位中心とは異なる位置の計測値を表示することにより分析を行う。測光器のデータ又はCCDカメラの画像データは照射部位中心とは異なる位置のデータを用いれば、励起光照射部位に発生するランプ又はレーザー装置、試料容器、レンズ、フィルター等、測光器、CCDカメラ等からの蛍光を概ね含まないデータを得られる。

【0023】ランプ、レーザーと測光器、CCDカメラとの位置は特に制限されるものではなく、的確に試料に励起光の照射がなされ、該試料より発光した蛍光を的確に測定できる位置であれば良い。

【0024】以下、本発明を具体的に実施例を用いて詳細に説明する。

【0025】

【実施例1】図1は、マイクロデバイス4内の試料の分析測定手法の1例である。マイクロデバイス4内の管又は溝部に試料5を置き、レーザー光照射部位に移動させレーザー2からの励起光を試料5に照射する。マイクロデバイスの表面上の試料を導く管又は溝の断面積は0.

$0.1 \sim 1 \mu\text{m}^2$ が好ましい。

【0026】その後試料 5 は管又は溝部を移動する。試料 5 が $1 \text{mm}/\text{秒}$ 移動する場合、励起光照射開始の 0.4m (ミリ) 秒後、試料 5 は $0.4 \mu\text{m}$ 励起光照射開始部位より移動している。励起光照射開始の $0.4 \sim 0.8 \text{m}$ 秒の間測光を行うのであれば、励起光照射部位より $0.4 \sim 0.8 \mu\text{m}$ まで移動した部位の測光を行う。レーザー光の光束の大きさを $0.2 \mu\text{m}$ とすると、レーザー光照射部位端より $0.4 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 移動した部位の測光データを試料の計測値とする。また、測光部位の所定の一点を通過した試料 5 の蛍光又は磷光の測光値の総和を試料の計測値とする。

【0027】励起光の光源は、キセノンランプ、タンクステンランプ等のランプ類、又はレーザー光等が好ましい。励起光の光束の大きさ(励起光照射部位)は測光部位にかかる程度の大きさが好ましい。励起光の光束が大きすぎる場合にはレンズあるいは光ファイバー等を用いて集光して照射部位を縮小することが好ましい。さらに、点灯消灯を繰り返しても、連続的に点灯し励起光照射部位に励起光を断続させ照射しても良い。

【0028】レーザーと測光器との位置関係は、特に限定されるものではなく、試料に対して的確に励起光の照射がなされ、試料より発光する蛍光、磷光を的確に測定できる位置であれば良い。

【0029】マイクロデバイスを介して励起光源と反対側に測光器を配置することもできる。この場合、励起光源はレーザー、適当な連続通電ランプ又はフラッシュランプ等のランプ類であっても良く、測光器は光電子増幅管、CCD カメラ、フォトダイオード、フォトダイオードアレー等が好ましく、望まれる波長光の検出が必要な部位で可能なものであれば良い。

【0030】

【実施例 2】図 2 は、試料導管より発せられた試料滴を試料導管の無い部位で計測する場合の 1 例を示す。試料 5 は導管の中を水圧又は電圧により導管 A 端より B 端までごく狭い間隙を移動する。この時、A 端に近い位置でレーザー光の励起を受け、それ以後から B 端までの時間を測光させる。試料 5 が $100 \text{mm}/\text{秒}$ で移動している場合、励起光照射開始の 0.4m (ミリ) 秒後、試料 5 は $40 \mu\text{m}$ 励起光照射開始部位より移動している。励起光照射開始の $0.4 \sim 0.8 \text{m}$ 秒の間測光を行うのであれば、試料は励起光照射部位より $40 \sim 80 \mu\text{m}$ まで移動し、レーザー光の光束の大きさを $1 \mu\text{m}$ とするならば、励起光照射部位端より $40 \sim 81 \mu\text{m}$ の部位の測光データより、この試料の計測データを得ればよい。試料滴は

連続していても良いし、断続し滴が形成されていても良い。試料滴の断面積は $0.01 \text{平方}\mu\text{m} \sim 10 \text{平方}\mu\text{m}$ が好ましい。

【0031】

【実施例 3】図 3 は、蛍光計測装置、マイクロデバイスを含む蛍光、磷光計測手法の 1 例を示す。

【0032】試料ディスク 9 にある試料 5 はマイクロポンプ 8 及び 6 により吸引される状態でマイクロデバイス 4 に送り込まれる。この試料 5 はマイクロデバイス 4 の試料導管を移動する過程で反応液と混合し反応される状態を形成することができる。

【0033】蛍光計測装置部位にある試料又はその反応物が照射光の照射を受け、蛍光あるいは磷光を発しつつ、測光部位に移動し測光器にて計測される。

【0034】マイクロポンプには小型の空気圧ポンプ、ガス圧ポンプ、ペリスタルティックポンプ等が使用できるが、指定された液の流速を実現でき、試料の流速を一定と出来るものが好ましい。計測の終了した試料は排液として排液入れに廃棄される。そして、試料の計測終了した後、マイクロデバイス内に洗浄液が吸引され試料導線が洗浄される。

【0035】

【発明の効果】以上に記載したように本発明によって以下の効果が得られる。

(1) フロウタイプ時間分解手法を用いた分析装置において、試料以外からの攪乱光(散乱光、干渉光、蛍光、磷光)が隠蔽されて、試料の測定感度が向上する。

(2) フロウタイプ時間分解手法を用いた分析システムは試料中の微量な物質の検出を感度良く、効率的に分析できる。

(3) フロウタイプ時間分解測定は励起光の連続点灯が可能であり、試料に対する励起光照射量が増え、高検出感度、短時間の測定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明のフロウタイプ時間分解手法の模式図である。

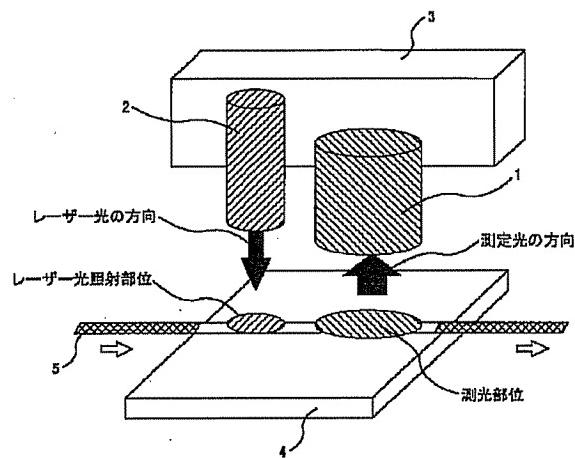
【図 2】本発明のフロウタイプ時間分解手法の別の模式図である。

【図 3】本発明のフロウタイプ時間分解手法を用いた分析システムの模式図である。

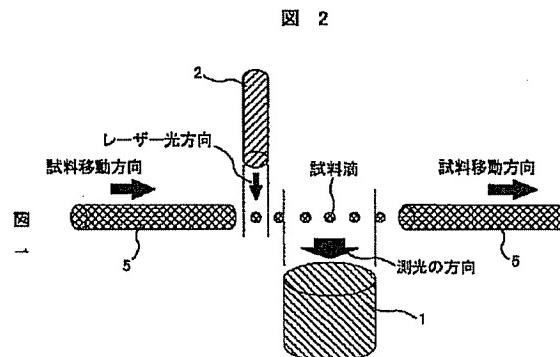
【符号の説明】

1…測光器、2…励起光光源(レーザー)、3…蛍光計測装置、4…マイクロデバイス、5…試料導線、6、8…マイクロポンプ、7…洗浄液タンク、9…試料ディスク、10…廃液入れ。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

